



PCT WELTOrganisation fÜr Geistiges Eigentum
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 5 : C07K 7/08, A61K 39/36 G01N 33/68		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 94/10194 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 11. Mai 1994 (11.05.94)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT93/00163			(74) Anwälte: ITZE, Peter usw. ; Amerlingstr. 8, A-1061 Wien (AT).
(22) Internationales Anmeldedatum: 25. Oktober 1993 (25.10.93)			(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, FI, JP, NO, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(30) Prioritätsdaten: A 2125/92 27. Oktober 1992 (27.10.92) AT A 43/93 14. Januar 1993 (14.01.93) AT			
(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): BIOMAY PRODUKTIONS- UND HANDELSGESELLSCHAFT M.B.H.[AT/AT]; Herrenstrasse 2, A-4020 Linz (AT).		Veröffentlicht	<i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>) : EBNER, Christof [AT/AT]; St. Elisabethplatz 4/13, A-1040 Wien (AT). FERREIRA, Fatima [BR/AT]; De Quergasse 6/3, A-1170 Wien (AT). SCHENK, Siegfried [AT/AT]; Schönlaterngasse 8/33, A-1010 Wien (AT). SZEPFALUSI, Zsolt [AT/AT]; Gaullachergasse 10, A-1160 Wien (AT). VALENTA, Rudolf [AT/AT]; Beethovenstrasse 18, A-2604 Theresienfeld (AT). BREITENBACH, Michael [AT/AT]; Helfertgasse 44, A-1120 Wien (AT). KRAFT, Dietrich [AT/AT]; Rebenvogel 1/18/1, A-1170 Wien (AT). RUMPOLD, Helmut [AT/AT]; Buchleitengasse 8/3, A-1180 Wien (AT). SCHEINER, Otto [AT/AT]; Hohe Wandstrasse 40, A-2364 Marianenzersdorf (AT).			
(54) Title: MOLECULE FRAGMENTS (PEPTIDES) OF THE MAIN ALLERGENS CONTAINED IN THE POLLEN OF TREES OF THE FAGALES ORDER			
(54) Bezeichnung: MOLEKÜLFRAGMENTE (PEPTIDE) DER HAUPTALLERGENE DER POLLEN VON BÄUMEN DER ORDNUNG FAGALES			
(57) Abstract			
The invention concerns the T-cell epitope of a 17 kD protein present as the main allergen contained in the pollen of trees of the <i>Fagales</i> order, in particular birches, hazels and alders, or generated by genetic engineering as a recombinant protein. Because of the high degree of affinity between said trees, their respective 17 kD proteins are also highly homologous. These proteins are designed as Bet v I, Cor a I and Aln g I in the international literature and cause tree pollen allergies in predisposed persons (allergic patients). The peptides derived from the main allergens (major allergens), in particular Bet v I, are suitable for diagnosing tree pollen allergy and are capable of stimulating (causing the proliferation, the cytokine production) or blocking T-cells of the patients <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> in an allergen-specific manner, or to provoke tolerance to the allergen-specific T-cells.			
(57) Zusammenfassung			
Die Erfindung bezieht sich auf T-Zell Epitope eines 17 kD Proteins, das als Hauptallergen der Baumpollen der Order <i>Fagales</i> , insbesondere Birke, Hasel und Erle in der Natur vorkommt oder auf gentechnologischem Wege als rekombinantes Protein erzeugt wird. Aufgrund der nahen Verwandtschaft der genannten Bäume besteht eine hohe Homologie auch der jeweiligen 17 kD Proteine, die gemäß der internationalen Literatur als Bet v I, Cor a I und Aln g I bezeichnet werden und in disponierten Personen (Allergikern) Baumpollenallergien hervorrufen. Die von den Hauptallergenen (major allergens), insbesondere Bet v I abgeleiteten Peptide eignen sich für die Diagnose der Baumpollenallergie und sind imstande T-Zellen der Patienten <i>in vitro</i> wie <i>in vivo</i> allergen-spezifisch zu stimulieren (Proliferation, Zytokinproduktion) oder zu blockieren bzw. zu einer Toleranz der allergenspezifischen T-Zellen zu führen.			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	CA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	CB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KC	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowenien
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TC	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolien	VN	Vietnam

Molekülfragmente (Peptide) der Hauptallergene der Pollen von Bäumen der
Ordnung Fagales

5 1. Gegenstand der Erfindung

Die Erfindung bezieht sich auf Molekülfragmente (Peptide) der Hauptallergene der Pollen von Bäumen der Ordnung *Fagales*, insbesondere von Birken, Haseln und Erlen. Im speziellen bezieht sich die Erfindung auf von Baumpollen-Allergenen 10 abgeleitete Peptidsequenzen, die im Rahmen der pathologischen Immunantwort für die überschießende IgE Antikörperproduktion der Baumpollenallergiker verantwortlich zu machen sind. Diese Peptide können sowohl innerhalb einer verbesserten Allergiediagnostik als auch *in vitro* und *in vivo* zur Induktion einer Immuntoleranz bzw. Anergie von allergenspezifischen T Zellen Verwendung finden.

15

2. Umfeld der Erfindung

Epidemiologische Studien zeigen, daß in den westlichen Industrieländern eine ständige Zunahme von Typ I Allergien (allergische Rhinitis, allergische 20 Conjunctivitis, allergisches Asthma) zu beobachten ist (1,2). Insbesonders kommt es durch den Pollenflug im Frühling und Frühsommer in den Ländern der nördlichen Hemisphäre zu den genannten IgE-bedingten Erkrankungen. Proteine von Pollen der Bäume der Order *Fagales*, speziell von Pollen der Birke, der Hasel, der Erle, der Hainbuche, der Eiche und der Edelkastanie können im Frühjahr für das Auftreten der 25 genannten Allergien verantwortlich gemacht werden (3). Wenigstens 30-40% der Pollenallergien sind durch diese Pollenallergene hervorgerufen. Diese Allergien werden durch IgE Antikörper ausgelöst, die Effektorzellen (Mastzellen der Schleimhäute und des Bindegewebes, basophile Granulozyten des Blutes) besetzen und bei Verbindung mit Pollenallergen zu einer Freisetzung von Entzündungsstoffen 30 führen (4). Die Bildung solcher IgE Antikörper erfolgt durch B Lymphozyten, die in Kooperation mit T Lymphozyten über deren lösliche Faktoren bzw. Zellkontakte

stimuliert werden (5). Am Beginn dieser Immunantwort stehen allergenpräsentierende Zellen (Monozyten, Makrophagen, Dendritenzellen etc.), die die Allergene aufnehmen, intrazellulär verarbeiten, um sie dann in Form von hochimmunogenen Peptiden zusammen mit Molekülen des 5 Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) T Lymphozyten darzubieten (6). Demnach spielen T Zellen innerhalb der IgE Antwort eine ganz bedeutende Rolle, da sie in allergenspezifischer Weise sowohl durch Zellkontakt als auch durch die Produktion von Zytokinen zur Aktivierung der B Lymphozyten führen und die überschießende IgE Produktion der B Zellen, bzw. der sich aus diesen entwickelnden 10 Plasmazellen einleiten.

Unter Verwendung von Pollenextrakten und gereinigten Allergenen sind in den letzten Jahren zahlreiche Teste für die Diagnose IgE bedingter Allergien entwickelt worden. Diese Testsysteme umfassen RIA (Radioimmunassay), IRMA (Immunradiometrische Assay), ELISA (Enzyme-linked immunosorbent Assay) LIA 15 (luminescence immunoassay), Immunoblots, Histamine-release-assay, T Zell Proliferationsassay und andere. Durch den Einsatz von allergenabgeleiteten gentechnologisch hergestellten oder synthetisierten Peptiden, die T Zell Erkennungsarealen entsprechen, kann in Zukunft sicherlich eine Verbesserung der genannten Testsysteme erreicht werden.

20 Seit Jahrzehnten werden IgE bedingte Allergien, insbesondere Pollenallergien durch die sogenannte Hyposensibilisierung therapiert (7). Diese Therapie besteht in der Zufuhr von Allergenextrakten in Form von Injektionen oder peroraler Applikation in wässriger Form als Tropfen oder als Nasenspray bzw. Augentropfen, in steigender Dosierung bis zur Erreichung einer Erhaltungsdosis über mehrere Jahre. 25 Effekte dieser Immuntherapie sind das Erreichen einer Toleranz gegenüber den eingesetzten Allergenen, was sich klinisch in einer deutlichen Abnahme der angeführten Krankheitssymptome bzw. in einer vollkommenen Symptomlosigkeit äußert (8). Da derzeit bei dieser Art der Behandlung immunogene Allergenpräparationen eingesetzt werden, sind Nebenwirkungen sehr häufig zu 30 beobachten. Bei Einsatz von allergenabgeleiteten, aber nichtanaphylaktisch wirkenden Peptiden, könnten risikolos höhere Dosen gegeben und damit eine

wesentliche Verbesserung der Hyposensibilisierung erreicht werden. Weiters bestehen aufgrund unserer Untersuchungen deutliche Hinweise für spezielle T Zell Bindungsareale auf Allergenen, sogenannte Epitope, die einerseits die Fähigkeit besitzen T Lymphozyten zu stimulieren und zur Proliferation anzuregen (siehe 5 Tabelle 1, in welcher ein Beispiel für T Zellklonreaktivität für die einzelnen Peptide angeführt ist), andererseits - in hohen Dosen - diese Zellen auch in einen Zustand der Toleranz bzw. Nicht-Reaktivität (Anergie) zu versetzen (9).

Die vorliegende Erfindung betrifft somit allergenabgeleitete Peptidsequenzen von Bet v 1, dem Hauptallergen von Birkenpollen, welche die Fähigkeit haben 10 Bet v I spezifische T Zellen bzw. Zellklone von Birkenpollen-Allergikern in der oben genannten Art zu beeinflussen. Aufgrund der hohen Homologie der "major allergens" Bet v I, Cor a I und Aln g I (10) sind die genannten Peptide weiters in der Lage in gleicher Weise T Zellen bzw. Zellklone von Patienten, die auf Hasel- oder Erlenpollen oder Pollen von anderen Bäumen der Order Fagales reagieren, in der 15 oben genannten Weise zu beeinflussen (siehe Tabelle 1, welche ein Beispiel für die Kreuzreaktivität der entsprechenden T Zellklone bezüglich der Allergene Bet v I, Cor a I und Aln g I wiedergibt). Das bedeutet, daß eine Therapie mit solchen, aufgrund einer Homologie über 75%, kreuzaktiven Peptiden geeignet ist eine Toleranz in Baumpollenallergikern zu erzeugen.

20

Tabelle 1: Kreuzreaktivität Bet v I-spezifischer Zellklone mit Cor a I und Aln g I

	KLON	HC26	SS6	DF16	HCS	FSS	AS27	BE15
25	NEG KO	0,5	0,5	0,4	0,2	0,03	0,1	0,06
	BET v I nat	11,9	9,03	32,2	90,4	1,43	5,7	66,8
	BET v I rec	6,5	5,77	30	87,7	5,24	4,5	75,7
	COR a I	ND	12,6	23,1	57,4	ND	10,4	65,9
30	ALN g I	ND	9,46	9,2	28,5	ND	9,3	28,7

Werte sind cpm (counts per minute) x 1000

ND: Experiment nicht durchgeführt

3. Beispiele

3.1. Primärantwort der T-Lymphozyten von Birkenpollenallergikern:

Blutabnahme erfolgte bei atopischen Patienten (typische Anamnese für eine Birkenpollenallergie, positiver Hauttest mit Birkenpollenallergenen, RAST-Klasse 3-5 mit Birkenpollenallergenen). Die Gewinnung von mononukleären Leukozyten 10 (PBMC) aus heparinisiertem Blut erfolgte mittels Gradientenzentrifugation (Ficoll). Lymphozytenaktivierung wurde fogendermaßen durchgeführt: Ansatz von 100.000 Zellen/Napf in 96-näpfigen Kulturplatten mit verschiedenen Bet v I Konzentrationen (zwischen 50 und 5 ug/ml). 5 Tage später Zugabe von 3H-Thymidin für weitere 12 Stunden, dann Auswertung der Lymphozytentransformation.

3.2. Allgenspezifische T Zelllinien:

500.000 PBMC wurden anschließend in 2 ml Medium (24-näpfige Kulturplatte) in Anwesenheit von Bet v I in optimaler Konzentration (im obengenannten Vorversuch bei jedem einzelnen Patienten ermittelt) kultiviert. Die stimulierbaren 20 T-Zellen (mit Bet v I Spezifität) exprimierten vermehrt Interleukin-2 (IL-2) Rezeptoren an ihrer Oberfläche und begannen sich zu Blasten zu transformieren und zu teilen. Diese Blastentransformation wurde nach 5 Tagen durch die Zugabe von IL-2 unterstützt. Nach 10-14 Tagen dominierten Bet v I spezifische Zellen in der Kultur. Diese wurden dann nach einem "limiting dilution" Verfahren auf 0,3 Zellen 25 pro Napf in Anwesenheit von 100.000 bestrahlten PBMC als "feeder-Zellen" in 96-näpfigen Platten auskloniert. Wachsende Kulturen wurden expandiert, auf ihre Spezifität überprüft, mittels Durchflußzytometrie (FACScan) phänotypisiert und dann den geplanten Untersuchungen zugeführt.

3.3. Charakterisierung von T Zellepitopen des Bet v I Moleküls:

Die Bindungsareale der Bet v I-spezifischen T Zellklone am Allergen wurden in Proliferationsversuchen (³H-Thymidin-Einbau) durch die Zugabe von jeweils einem Peptid ermittelt. Zu diesem Zweck wurde die Reaktivität auf Dodekapeptide getestet, die entsprechend der Aminosäuresequenz von Bet v I synthetisiert worden waren. Diese Peptide überspannten jeweils 10 gemeinsame Aminosäuren und überlappten mit den zwei in der Sequenz folgenden. Im einzelnen wurde so vorgegangen: im ersten Durchgang wurden jeweils 20.000 Zellen des Bet v I spezifischen Klons mit autologen bestrahlten PBMC (Antigen-präsentierende Zellen) und jeweils 1 µg Peptid der eingesetzten 75 Peptide pro Napf inkubiert. Als 10 Positivkontrolle dienten gereinigte native und rekombinante Bet v I Moleküle (2 µg/Napf) sowie Werte einer maximalen T Zellstimulation durch die Kombination von Phytohämagglutinin A und IL-2. Als Negativkontrolle wurden Ansätze verwendet, die in den Näpfen nur Klonzellen allein bzw. Klonzellen mit autologen bestrahlten feeder Zellen ohne Zugabe von Antigen bzw. Peptid inkubiert worden waren. Jene Peptide, 15 die eine starke Proliferation des Klons hervorriefen, wurden in einem zweiten Proliferationsversuch in dreifach-Ansätzen getestet, um die Spezifität des Klons für die entsprechende Aminosäuresequenz zu sichern.

Auf diese Weise wurden 30 Bet v I-spezifische T Lymphozytenklone von 9 Patienten gewonnen, das heißt, daß von jedem Patienten mehrere Klone auf 20 Peptidreakтивität getestet werden konnten. Folgende Peptide führten zu einer Reaktivität der als repräsentative Beispiele genannten T Zellklone (siehe Tabelle 2):

	Aminosäuren Position in der Bet v I Sequenz:	Bezeichnung der Klone
25		
	GVFNYETETTSVIPAA	1 - 16 HC26
	TTSVIPAARLFKAFIL	9-26 SS6
	DNLFPKVAPQAISSVE	29-44 SAZ53/III
30	PQAISSVENIEGNG	35-48 HC3/III

6

GPPFKYVKDRVDEV DHTN	61 -76	DF16
DWINKYVNSVIEGGP	75-90	HCS
YSVIEGGPIGDTLEKI	84-97	FS5
5 DTLEKISNEIKIVATPDG	93-110	HC2/III
GSILKISNKYHTKGDH	111-126	AS2 7
ETLLRAVESYLLAHSDAYN	141-159	BE15

10

15

20

25

30

Tabelle 2: Reaktivität Bet v 1-spezifischer Lymphozytenklone.

Je ein repräsentatives Experiment mit einem Klon pro Epitop ist angeführt

KLON	HC26	SS6	SAZ3III	HC3III	DF16	HCS	FSS	HC2III	AS27	BE15
NEG KO	0,5	0,5	3,1	1,2	0,16	0,06	0,03	0,9	0,1	0,14
BET v 1 nat	11,9	9,03	41,1	31,9	51,6	69,3	5,24	78	5,7	8,51
BET v 1 rec	6,5	5,77	52,9	29,6	50,7	68,1	1,43	ND	4,5	10,6
Aminosäuren	1 bis 16	9 bis 26	29 bis 44	35 bis 48	61 bis 76	75 bis 90	84 bis 97	93 bis 110	111 - 126	141 - 159
EPITOP	47,2	30	28,9	29,1	48,8	34,4	1,73	78,6	2,46	10,2

Werte entsprechen cpm (counts per minute) x 1000

ND: Experiment wurde nicht durchgeführt

Internationaler Ein-Buchstaben-Kode für Aminosäuren:

- 5 A: Alanin
 C: Cystein
 D: Asparaginsäure
 E: Glutaminsäure
 F: Phenylalanin
10 G: Glycin
 H: Histidin
 I: Isoleucin
 K: Lysin
 L: Leucin
15 M: Methionin
 N: Asparagin
 P: Prolin
 Q: Glutamin
 R: Arginin
20 S: Serin
 T: Threonin
 V: Valin
 W: Tryptophan
 Y: Tyrosin

25

30

4. Literatur

1. Wüthrich B. Allergy and Clin Immunol News 3, 41 (1991).
- 5 2. Miyamoto, T., Advances in Allergology and Clinical Immunology.
Eds. Ph Godard, J. Bousquet, F.B. Michel. EAACI Congress Paris, 10-15
May 1992, The Parthenon Publishing Group, Casterton Hall U.K., New
Jersey, U.S.A. p. 343.
3. Jarolim E., Rumpold, H., Endler, A.T., et al. Allergy 44, 385 (1989).
- 10 4. Roitt, I., Essential Immunology. 6th Edition 1991.
- 5 5. Parronchi, P., Macchia, D., Piccini, M.P., et al. Proc. Natl. Acad.
Sci. U.S.A. 88, 4538 (1991).
6. Schwartz, R. H. Ann. Rev. Immunol. 3, 237 (1985).
- 15 7. Bousquet, J., Becker W.M., Heijaoudi, A., et al. J Allergy Clin
Immunol 88, 43 (1991).
8. Birkner, T., Rumpold H., Jarolim, E., et al. Allergy 45, 418 (1990).
9. Rothbard, J.B., Gefter, M.L., Ann Rev Immunol 9, 527 (1991).
10. Valenta, R., Breiteneder H., Pettenburger K., et al. J Allergy Clin
Immunol 87, 677 (1991).

20

25

30

Patentansprüche

5 1. Molekülfragmente (Peptide) der Hauptallergene der Pollen von Bäumen der
Ordnung Fagales insbesondere von Birken, Haseln und Erlen, dadurch
gekennzeichnet, daß sie T Zellklone oder T Zelllinien, die von gegen Pollen der
Ordnung Fagales allergischen Patienten stammen, allergenspezifisch stimulieren oder
blockieren, das heißt zur Toleranz (Anergie) dieser T Zellen führen, und wenigstens
10 eines der aus der folgenden Gruppe ausgewählten Peptide:

GVFNYETETTSVIPAA
~~TISYVPAARLFKAFL~~
~~DNLEPKVAPQAISSE~~
PQAISSEVENIEGNS
15 GFPFKYVKDRVDEVDTN
DHTNFKNYSVIEGGP
YSVIEGGPIGDTLEKI
DTLEKISNEIKIVATPDG
GSILKISNKYHTKGDH
20 ETLLRAVESYLLAHSDAYN
aufweisen, bzw. Peptide, die zu den genannten Peptiden kreuzreaktive
Eigenschaften zeigen.

2. Molekülfragmente nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie zu den
25 angeführten Molekülfragmenten eine hohe Homologie, insbesondere über 75%
besitzen.

3. Molekülfragmente nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie zu den
angeführten Peptiden eine hohe Homologie, insbesondere über 75%, besitzen, *in*
30 *vitro* und *in vivo* zu einer T Zell Toleranz führen können und sich daher zur
Diagnostik und Therapie allergischer Erkrankungen eignen.



PCT
WELTOORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 5 : C12N 15/29, A61K 39/36 G01N 33/53		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 94/10194 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 11. Mai 1994 (11.05.94)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT93/00163		(74) Anwälte: ITZE, Peter usw. ; Amerlingstr. 8, A-1061 Wien (AT).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 25. Oktober 1993 (25.10.93)		(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, FI, JP, NO, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(30) Prioritätsdaten: A 2125/92 27. Oktober 1992 (27.10.92) AT A 43/93 14. Januar 1993 (14.01.93) AT		(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): BIO-MAY PRODUKTIONS- UND HANDELSGESELLSCHAFT M.B.H. (AT/AT); Herrenstrasse 2, A-4020 Linz (AT).	
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): EBNER, Christof [AT/AT]; St. Elisabethplatz 4/13, A-1040 Wien (AT). FERREIRA, Fatima [BR/AT]; De Quergasse 6/3, A-1170 Wien (AT). SCHENK, Siegfried [AT/AT]; Schönlaternagasse 8/33, A-1010 Wien (AT). SZEPFALUSI, Zsolt [AT/AT]; Gaullachergasse 10, A-1160 Wien (AT). VALENTA, Rudolf [AT/AT]; Beethovenstrasse 18, A-2604 Theresienfeld (AT). BREITENBACH, Michael [AT/AT]; Helfertgasse 44, A-1120 Wien (AT). KRAFT, Dietrich [AT/AT]; Rebenweg 1/18/1, A-1170 Wien (AT). RUMPOLD, Helmut [AT/AT]; Buchleitengasse 8/3, A-1180 Wien (AT). SCHEINER, Otto [AT/AT]; Hohe Wandstrasse 40, A-2364 Marianenzersdorf (AT).		(76) Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(54) Title: MOLECULE FRAGMENTS (PEPTIDES) OF THE MAIN ALLERGENS CONTAINED IN THE POLLEN OF TREES OF THE FAGALES ORDER		(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 1. September 1994 (01.09.94)	
(54) Bezeichnung: MOLEKÜLFRAGMENTE (PEPTIDE) DER HAUPTALLERGENE DER POLLEN VON BÄUMEN DER ORDNUNG FAGALES			
(57) Abstract			
<p>The invention concerns the T-cell epitope of a 17 kD protein present as the main allergen contained in the pollen of trees of the <i>Fagales</i> order, in particular birches, hazels and alders, or generated by genetic engineering as a recombinant protein. Because of the high degree of affinity between said trees, their respective 17 kD proteins are also highly homologous. These proteins are designed as Bet v I, Cor a I and Aln g I in the international literature and cause tree pollen allergies in predisposed persons (allergic patients). The peptides derived from the main allergens (major allergens), in particular Bet v I, are suitable for diagnosing tree pollen allergy and are capable of stimulating (causing the proliferation, the cytokine production) or blocking T-cells of the patients <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> in an allergen-specific manner, or to provoke tolerance to the allergen specific T-cells.</p>			
(57) Zusammenfassung			
<p>Die Erfinlung bezieht sich auf T Zell Epitope eines 17 kD Proteins, das als Hauptallergen der Baumpollen der Order <i>Fagales</i>, insbesondere Birke, Hasel und Erle in der Natur vorkommt oder auf gentechnologischem Wege als rekombinantes Protein erzeugt wird. Aufgrund der nahen Verwandtschaft der genannten Bäume besteht eine hohe Homologie auch der jeweiligen 17 kD Proteine, die gemäß der internationalen Literatur als Bet v I, Cor a I und Aln g I bezeichnet werden und in disponierten Personen (Allergikern) Baumpollenallergien hervorrufen. Die von den Hauptallergenen (major allergens), insbesondere Bet v I abgeleiteten Peptide eignen sich für die Diagnose der Baumpollenallergie und sind imstande T Zellen der Patienten <i>in vitro</i> wie <i>in vivo</i> allergen-spezifisch zu stimulieren (Proliferation, Zytokinproduktion) oder zu blockieren bzw. zu einer Toleranz der allergenspezifischen T Zellen zu führen.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauritanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Bulgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KC	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowakenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TC	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MU	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolci	VN	Vietnam

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interr	Application No
PCT/AT 93/00163	

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 5	C12N15/29	A61K39/36
		G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 5	C12N	A61K	C07K
-------	------	------	------

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
--

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WO,A,92 02621 (BIOMAY BIOTECHNIK PRODUKTIONS- UND HANDELSGESELLSCHAFT M.B.H.) 20 February 1992 see page 4, line 12 - page 5, line 27; claim 3</p> <p>---</p> <p>INT.ARCHIVES OF ALLERGY AND APPLIED IMMUNOLOGY, vol.89, no.4, 1989 page 410-415</p> <p>S.ELSAYED ET AL. 'Synthetic allergenic epitopes from the amino-terminal regions of the major allergens of hazel and birch pollen' see figure 2</p> <p>---</p> <p>-/-</p>	1-3
X		1-3

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *A* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 May 1994

Date of mailing of the international search report

03.08.94

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 cpo nl.
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

CUPIDO, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intell.	Application No
PCT/AT 93/00163	

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>EMBO JOURNAL., vol.8, no.7, July 1989, EYNSHAM, OXFORD GB pages 1935 - 1938</p> <p>H.BREITENEDER ET AL. 'The gene coding for the major birch pollen allergen BetvI, is highly homologous to a pea disease resistance response gene' see figure 1</p> <p>-----</p>	1-3

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/AT 93/00163**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see Annex

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-3 (all in part)

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AT 93/00163

- 1.- Claims 1-3 (all in part): Peptides with sequences GVFNYETETTSVIPAA and TTSSVIPAPAARLFKAFL
- 2.- Claims 1-3 (all in part): Peptides with sequences DNLFPKVAPQAISSE and PQAISSEVENIEGNG.
- 3.- Claims 1-3 (all in part): Peptide with sequence GFPFKYYVKDRVDEVHTN.
- 4.- Claims 1-3 (all in part): Peptides with sequences DHTNFKYNNYSVIEGGP and YSVIEGGPIGDLEKI
- 5.- Claims 1-3 (all in part): Peptid with sequence DTLEKISNEIKIVATPDG.
- 6.- Claims 1-3 (all in part): Peptid with sequence GSILKISNKYHTKGDH.
- 7.- Claims 1-3 (all in part): Peptid with sequence ETLLRAVESYLLAHSDAYN.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inten. Appl. No.

PCT/AT 93/00163

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9202621	20-02-92	AU-A-	8311291	02-03-92
		CA-A-	2067144	09-02-92
		EP-A-	0495052	22-07-92
		JP-T-	5501656	02-04-93

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. Aktenzeichen PCT/AT 93/00163

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 5 C12N15/29 A61K39/36 G01N33/53
--

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprästoff (Klassifikationssystem und Klassifikationsymbole)

IPK 5 C12N A61K C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprästoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO,A,92 02621 (BIOMAY BIOTECHNIK PRODUKTIONS- UND HANDELSGESELLSCHAFT M.B.H.) 20. Februar 1992 siehe Seite 4, Zeile 12 - Seite 5, Zeile 27; Anspruch 3 ---	1-3
X	INT.ARCHIVES OF ALLERGY AND APPLIED IMMUNOLOGY, Bd.89, Nr.4, 1989 Seite 410-415 S.ELSAIED ET AL. 'Synthetic allergenic epitopes from the amino-terminal regions of the major allergens of hazel and birch pollen' siehe Abbildung 2 ---	1-3 -/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindnerischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindnerischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- *&* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
2. Mai 1994	03.08.94
Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter CUPIDO, M

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern	ales Aktenzeichen
PCT/AT 93/00163	

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>EMBO JOURNAL, Bd.8, Nr.7, Juli 1989, EYNSHAM, OXFORD GB Seiten 1935 - 1938</p> <p>H.BREITENEDER ET AL. 'The gene coding for the major birch pollen allergen BetvI, is highly homologous to a pea disease resistance response gene' siehe Abbildung 1</p> <p>-----</p>	1-3
2		

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHTinternationales Aktenzeichen
PCT/AT93/00163**Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt I auf Blatt 1)**

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr. weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. Ansprüche Nr. weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe anhang

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:
1-3 (alle teilweise)

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

 Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt. Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

- 1.- Ansprüche 1-3 (alle teilweise): Peptide mit den Sequenzen GVFNYETETTSVIPAA und TTSSVIPAARLFKAFIL
- 2.- Ansprüche 1-3 (alle teilweise): Peptide mit den Sequenzen DNLFPKVAPQAIISSVE und PQAISSVENIEGNG.
- 3.- Ansprüche 1-3 (alle teilweise): Peptid mit der Sequenz GFPFKYVKDRVDEVDHNTN.
- 4.- Ansprüche 1-3 (alle teilweise): Peptide mit den Sequenzen DHTNFKYNNYSVIEGGP und YSVIEGGPIGDITLEKI
- 5.- Ansprüche 1-3 (alle teilweise): Peptid mit der Sequenz DTLEKISNEIKIVATPDG
- 6.- Ansprüche 1-3 (alle teilweise): Peptid mit der Sequenz GSILKISNKYHTKGDH.
- 7.- Ansprüche 1-3 (alle teilweise): Peptid mit der Sequenz ETLLRAVESYLLAHSDAYN.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internales Aktenzeichen

PCT/AT 93/00163

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO-A-9202621	20-02-92	AU-A-	8311291	02-03-92